

不同级别胚胎对小鼠子宫内膜的诱导作用研究

李为玉, 李婷婷, 陈攀宇, 方 丛

(中山大学附属第六医院生殖医学研究中心, 广东 广州 510655)

摘要:【目的】探讨不同级别胚胎对子宫内膜肝素结合表皮生长因子(HBEGF)和白白血病抑制因子(LIF)的诱导作用。【方法】选用 4~6 周昆明小鼠,实验分为以下 6 组进行胚胎移植:①8 细胞胚胎(8c),②8 细胞胚胎+4 细胞胚胎(8c+4c),③8 细胞胚胎+2 细胞胚胎(8c+2c),④4 细胞胚胎(4c),⑤2 细胞胚胎(2c),⑥5 μ L 培养液为对照组(NC)。收集小鼠子宫内膜标本行荧光定量 PCR、免疫组织化学、Western blotting 技术检测 HBEGF、LIF 的表达情况;移植后第 7 天取出子宫,观察胚胎种植情况。【结果】各组间 HBEGF 和 LIF 的 mRNA 及蛋白的表达水平均具有显著统计学差异(P 均 <0.001)。组间比较发现:8c+4c 与 8c+2c 两组间 HBEGF、LIF 表达量没有显著性差异($P>0.05$),但较 8c 组相比有显著性提高($P<0.05$);4c 与 2c 两组间 HBEGF、LIF 表达量没有显著性差异($P>0.05$),但较 NC 组相比有显著性增加($P<0.001$),较 8c 组有显著性降低($P<0.05$);8c+4c 与 8c+2c 两组的胚胎种植数较 8c 组有提高的趋势。【结论】胚胎对子宫内膜容受性因子 HBEGF 和 LIF 具有正向诱导作用,4 细胞和 2 细胞胚胎诱导作用的强弱没有显著性差异,4 细胞和 2 细胞胚胎对子宫内膜容受性的诱导作用低于 8 细胞胚胎。

关键词:子宫内膜容受性;非优质胚胎;肝素结合表皮生长因子;白血病抑制因子

中图分类号:R715 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-3554(2016)02-0228-07

Different Quality Embryo Induce Receptivity of Mice Endometrium

LI Wei-yu, LI Ting-Ting, CHEN Pan-yu, FANG Cong

(Reproductive Center, The Sixth Affiliated Hospital of SUN Yat-sen University, Guangzhou 510610, China)

Corresponding to: FANG Cong, E-mail: fangconggd@foxmail.com

Abstract:【Objective】To investigate endometrium heparin binding epithelial growth factor (HBEGF) and leukemia inhibitory factor (LIF) expression induced by different stage of mouse embryos.【Methods】The embryos transferred to pseudopregnant mouse were divided into 6 groups: ①8 cell embryo (8c), ②8 cell embryo + 4 cell embryo (8c+4c), ③8 cell embryo + 2 cell embryo (8c+2c), ④4 cell embryo (4c), ⑤2 cell embryo (2c), ⑥5 μ L medium (normal control, NC). Fluorescent quantitation PCR, immunohistochemistry, and Western blot analysis were performed to detect HBEGF and LIF expression levels in the mice endometrium. To observe the implantation numbers after 7 days of embryo transfer.【Results】The mRNA and protein expression level of HBEGF and LIF had significant difference among groups (all $P < 0.001$). The expression of HBEGF and LIF had no significant difference between group 8c+4c and 8c+2c ($P > 0.05$), but had significant difference compared with group 8c ($P < 0.05$). The expression of HBEGF and LIF had no significant difference between group 4c and 2c ($P > 0.05$), but had significant difference compared with group NC ($P < 0.001$). The implantation number of group 8c+4c and 8c+2c had an upward tendency compared with group 8c.【Conclusion】Poor quality embryo could induce endometrium receptivity factors HBEGF and LIF expression. The inducing effects had no significant difference between different poor stage embryos. The inducing effects of poor embryo were lower than good embryo.

Key words: endometrium receptivity; poor quality embryo; heparin binding epithelial growth factor; leukemia inhibitory factor

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2016, 37(2): 228-234]

收稿日期: 2015-10-12

基金项目: 广东省自然科学基金(s20130100113404)

作者简介: 李为玉, 硕士研究生, 研究方向: 生殖医学, E-mail: liweiyu-sysu@foxmail.com; 方丛, 通信作者, 主任医师, 硕士生导师, 研究方向: 生殖医学, E-mail: fangconggd@foxmail.com

胚胎着床是一个复杂的、影响妊娠成功与否的最重要过程,保证这一过程顺利完成的三要素:胚胎发育潜能^[1]、子宫内膜容受性以及胚胎与子宫内膜的协调同步相互作用^[2]。子宫内膜是人体中具有自我更新能力的组织之一,它存在的核心目标是让胚胎在短暂的着床窗口期种植并孕育生命。如何调节子宫内膜容受性从而提高胚胎种植率成为提高体外受精胚胎移植 (in vitro fertilization, IVF) 临床妊娠率的关键^[3-4]。Ueda 等^[5]通过小鼠胚胎的非同步移植模型证实发育较早的胚胎可以诱导着床窗口的提前开放,说明胚胎对子宫内膜容受性具有调整作用。Teklenburg 等^[6]通过体外实验研究认为停滞胚胎并没有沉默,而是能引起蜕膜化基质细胞胚胎种植相关信号的强烈反应。本课题组前期动物实验证实小鼠早期完整胚胎对子宫内膜容受性具有诱导作用^[7]。那么不同质量的完整胚胎对子宫内膜的诱导作用如何,非优质胚胎能否通过提高子宫内膜容受性而促进优质胚胎的着床。国内尚无相关报道,本研究旨在通过小鼠体内实验探讨不同等级完整胚胎对子宫内膜容受性因子肝素结合表皮生长因子 (heparin binding epithelial growth factor, HBEGF) 和白白血病抑制因子 (leukemia inhibitory factor, LIF) 的诱导作用。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 动 物 SPF 级昆明小鼠,雌性 4~6 周,体质量 28~35 g,雄鼠 6~8 周,体质量 35~42 g,由中山大学动物中心提供,动物合格证号为 44008500010142。

1.1.2 主要仪器和试剂 孕马血清促性腺激素 (pregnant mare serum gonadotrophin, PMSG) 和人绒毛膜促性腺激素 (human chorionic gonadotropin, HCG) (宁波激素制品厂);解剖镜及倒置显微镜 (Nikon)、二氧化碳孵箱 (Thermo Forma)、Mini-Protein 电泳系统 (Bio-Rad)、ABI 3900 台式高通量 DNA 合成仪 (USA ABI)、ABI 7500 全自动荧光定量 PCR 仪 (USA ABI)、Trizol (Sigma)、RT-PCR 试剂盒 (Toyobo)、荧光定量 PCR 试剂盒 (ABI); M2 培养基 (Sigma)、多聚甲醛 (Sigma)、免疫组化试剂盒 (DAKO)、PVDF 膜 (Millipore)、HBEGF I 抗 (Abcam)、LIF I 抗 (Santa-cruz)、GAPDH (Proteintech)、II 抗

(Proteintech)、BSA (sigma)、odyssey 双色红外激光成像系统 (美国 LI-COR 公司)。

1.2 输精管结扎

选取 8 周雄性昆明小鼠,通过阴囊将两侧输精管离断。术后 2 周与正常雌鼠合笼,检栓阳性小鼠继续饲养 7 d 处死后未怀孕,证明不育种公鼠造模成功。

1.3 小鼠促排卵

小鼠腹腔注射 PMSG 10U,48 h 后注射 HCG 10U,造成超排卵,HCG 日雌雄按 2:1 合笼,次晨检查阴栓,发现阴栓为妊娠第 1 天 (d1),与正常公鼠合笼检栓阳性后于孕第 2 天获得 2 细胞胚胎;未促排小鼠与输精管结扎小鼠合笼检栓阳性获得假孕小鼠。

1.4 小鼠胚胎体内移植

将获得的 2 细胞胚胎体外培养至 8 细胞阶段 (约妊娠第 3 天上午),根据 Gorden 标准将不同质量的胚胎分为以下 6 组移植入假孕小鼠子宫内:①4 枚优质 8 细胞胚胎 (8c),②4 枚优质 8 细胞胚胎+2 枚 4 细胞胚胎 (8c+4c),③4 枚优质 8 细胞胚胎+2 枚 2 细胞胚胎 (8c+2c),④4 枚 4 细胞胚胎 (4c),⑤4 枚 2 细胞胚胎 (2c),⑥移植 5 μ L 培养液为对照组 (NC)。其中 4 细胞和 2 细胞胚胎定义为非优质胚胎,8 细胞胚胎为优质胚胎。移植后 36 h 于孕第 4 天夜间取出小鼠子宫及子宫内膜行荧光定量免疫组织化学、PCR、Western blotting 技术进行检测,每组 10 例标本。移植后第 7 天取出子宫,子宫内肉眼可见的胚泡着床即说明胚胎种植,比较各组中胚胎种植情况,即比较各组中胚泡着床数量。

1.5 子宫内膜容受性检测

子宫内膜组织一部分直接置入 40 g/L 多聚甲醛液中,行免疫组织化学检测容受性因子 HBEGF、LIF 的表达;一部分置于液氮中,待行荧光定量 PCR、western blotting 检测 HBEGF、LIF 的表达量。

1.5.1 免疫组化 子宫内膜标本经 40 g/L 多聚甲醛固定,常规石蜡包埋切片,切片烘干后二甲苯脱蜡 10 min \times 3 次,梯度酒精复水 (100%、95%、85%、75%) 各 3 min,柠檬酸钠抗原修复,过氧化氢封闭内源性过氧化物酶 1 h,山羊血清 (SP9001 试剂 A) 封闭 30 min, I 抗孵育 4 $^{\circ}$ C 过夜,滴加二抗室温孵育 30 min (DAKO A),DAB 显色 (DAKO B:

C=50:1), 苏木素复染 1 min, 脱水透明后中性树胶封片。每张切片随机选取 5 个高倍视野($\times 400$), Image-Pro Plus 6.0 分析着色区域积分吸光度值。

1.5.2 Western blotting 总蛋白提取试剂盒提取总蛋白, BCA 法(碧云天)检测蛋白浓度; 12% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺(SDS-PAGE)凝胶电泳; 80 V, 45 min, 120 V, 40 min, 转膜时间根据分子量分别为 HBEGF 35 min、LIF 45 min (恒压 25mV, 限流 0.4A); 5% BSA 封闭液封闭 1 h; I 抗 4 °C 摇床过夜; II 抗室温孵育 1 h; TBST 液洗膜 3 次后于 odyssey 双色红外激光成像系统(美国 LI-COR 公司)扫膜成像, 用 Quantity One 软件进行灰度分析。

1.5.3 实时荧光定量 PCR 采用 Trizol 法提取总 RNA, 逆转录试剂盒(Toyobo)进行逆转录; SYBR-green 荧光定量 PCR 试剂盒(applied Biosystem)在 ABI7500 上进行整合素 HBEGF mRNA、LIF mRNA 定量分析, 引物和实验条件具体见表 1, 以 GAPDH 为参照基因, 检测重复 3 次。

1.6 统计学处理

应用 SPSS 13.0 进行统计分析, 数值变量用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 多组定量资料的比较采用方差分析, 多个样本均数间两两比较采用 LSD-*t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大体观察胚胎种植情况

胚胎种植各组间差异具有显著统计学意义($F = 128.5, P < 0.001$), 8c+4c, 8c+2c 和 8c 明显高于

表 1 引物序列及主要参数

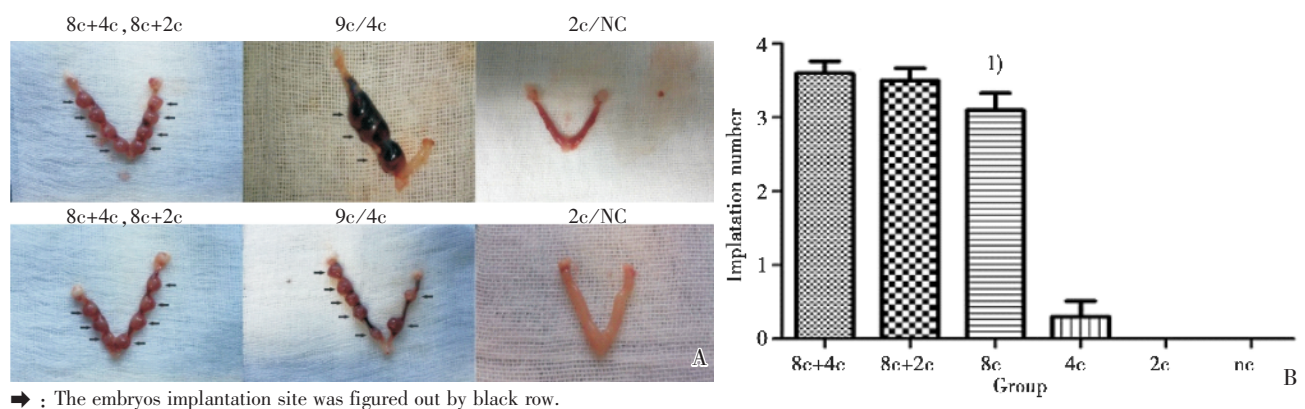
Table 1 Primers and major parameters used in the quantitative analyses

Gene	Sequence(5'-3')	T/°C	Size/bp
HBEGF	5-AAGTGAAGTTGGGCTGGCTA-3(forward)	62.2	92
	5-CGTGTAACGAACCACTGTCTCAGAA-3(reverse)	63.4	
LIF	5'-GCTATGTGCGCCTAACATGA-3(forward)	57.2	148
	5'-ACTGGGGTTTCAGGACCTTCT-3(reverse)	57.3	
GAPDH	5-TGTGTCCGTCGTGGATCTG-3(forward)	57.5	150
	5-TTGCTGTTGAAGTCGCAGGAG-3(reverse)	61.3	

4c, 2c 和 NC 组。其中 8c+4c 组(3.6 ± 0.52)和 8c+2c 组(3.5 ± 0.53)胚胎种植数较多且相近, 差异无显著统计学意义($P = 0.661$)。8c+4c 组胚胎种植数明显高于 8c 组(3.1 ± 0.74), 具有统计学差异($P = 0.032$)。4c 组胚胎种植率极低(0.3 ± 0.68), 2c 组中则没有胚胎种植(图 1)。

2.2 荧光定量 PCR 结果

假孕小鼠胚胎移植后 36 h, 各组 HBEGF 和 LIF 的 mRNA 表达量均具有显著统计学差异($F = 530.1, P < 0.001; F = 327.8, P < 0.001$)。其中 8c+4c、8c+2c、8c 组 HBEGF mRNA 表达量呈递减趋势, 且组间比较差异有统计学意义($P < 0.001$), 4c 与 2c 两组间 HBEGF mRNA 表达量没有显著性差异($P = 0.551$), 但较 NC 组相比有显著性提高($P < 0.001$), 较 8c 组有显著性降低($P < 0.001$); 8c+4c 与 8c+2c 两组间 LIF mRNA 表达量没有显著性差异($P = 0.204$), 但较 8c 组相比有统计学差异($P < 0.001$), 4c 与 2c 两组间 LIF mRNA 表达量没有显著性差异($P = 0.527$), 但较 NC 组相比有显著性提

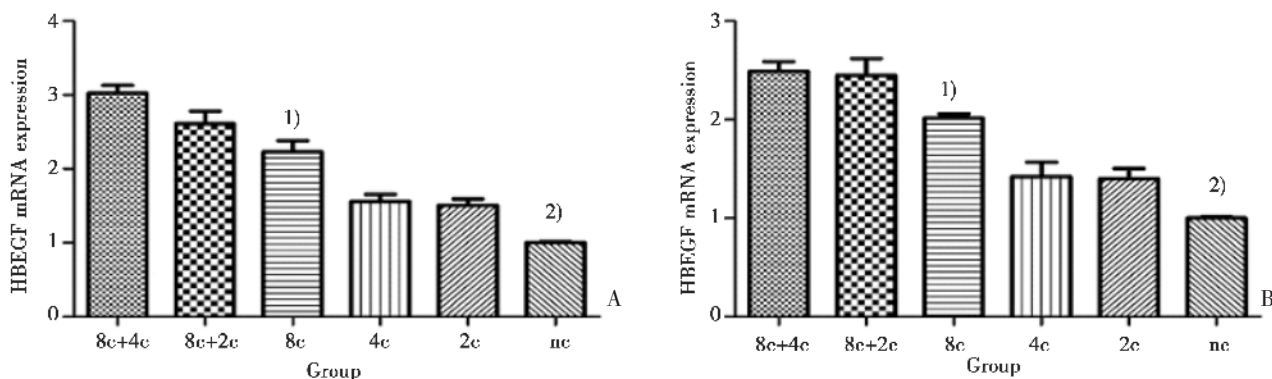


➡: The embryos implantation site was figured out by black row.

8c, 4c, 2c: 8, 4, 2 cell embryo; NC: 5 μ L medium (normal control). The implantation number had significant difference among the groups ($F = 128.5, P < 0.001$); 1) group 8c+4c vs 8c, $P = 0.032$.

图 1 胚胎种植图

Fig.1 Embryos implantation



The mRNA expression level of HBEGF and LIF had significant difference among the groups, $\bar{x} \pm s, n = 10$. RT-PCR ($F = 530.1, P < 0.001; F = 327.8, P < 0.001$). 1) Group 8c+4c and 8c+2c vs 8c, $P < 0.001$; Group 4c and 2c vs 8c, $P < 0.001$. 2) Group 4c and 2c vs NC, $P < 0.001$.

图 2 子宫内膜容受性因子 HBEGF、LIF 的 mRNA 表达水平

Fig.2 HBEGF and LIF expression levels in the mice endometrium

高 ($P < 0.001$), 较 8c 组有显著性降低 ($P < 0.001$, 图 2)。

2.3 免疫组织化学结果

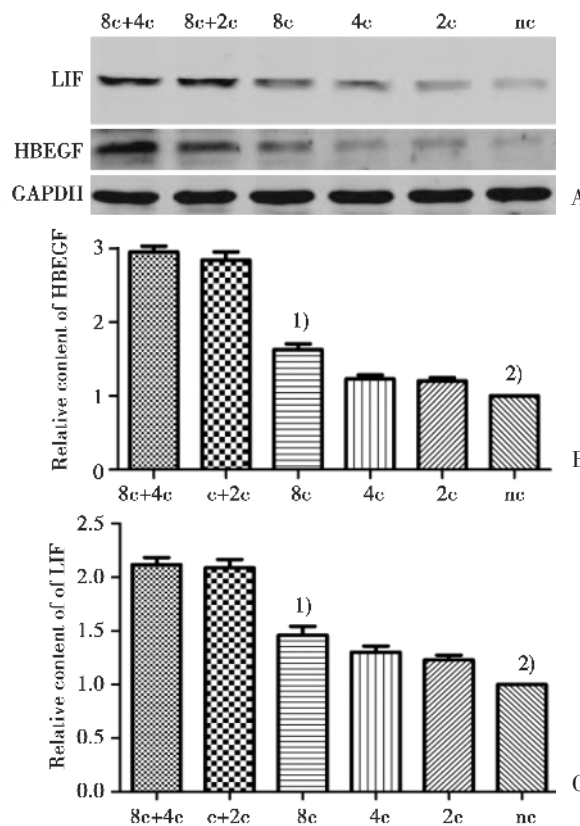
假孕小鼠胚胎移植后 36 h HBEGF、LIF 主要表达与子宫内腔上皮和腺上皮部位, 且各组间差异具有显著统计学意义 ($F = 22.7, P < 0.001; F = 29.2, P < 0.001$)。8c+4c 与 8c+2c 两组间 HBEGF、LIF 表达量没有显著性差异 ($P = 0.573, P = 0.403$), 但较 8c 组相比有统计学差异 ($P < 0.05$), 4c 与 2c 两组间 HBEGF、LIF 表达量没有显著性差异 ($P > 0.05$), 但较 NC 组相比有显著性提高 ($P < 0.001$), 较 8c 组相比有显著性降低 ($P < 0.05$, 图 3)。

2.4 Western blotting 结果

各组间 HBEGF、LIF 蛋白表达水平具有显著统计学差异 ($F = 150.2, P < 0.001; F = 58.3, P < 0.001$)。其中 8c+4c 与 8c+2c 两组间 HBEGF、LIF 蛋白表达量没有明显差异 ($P = 0.272, P = 0.738$), 但较 8c 组有提高趋势 ($P < 0.001$), 4c 与 2c 两组间 HBEGF、LIF 表达差异不明显 ($P = 0.807, P = 0.418$), 但较 NC 组有提高 ($P < 0.001$), 较 8c 组有降低趋势 ($P < 0.001$, 图 4)。

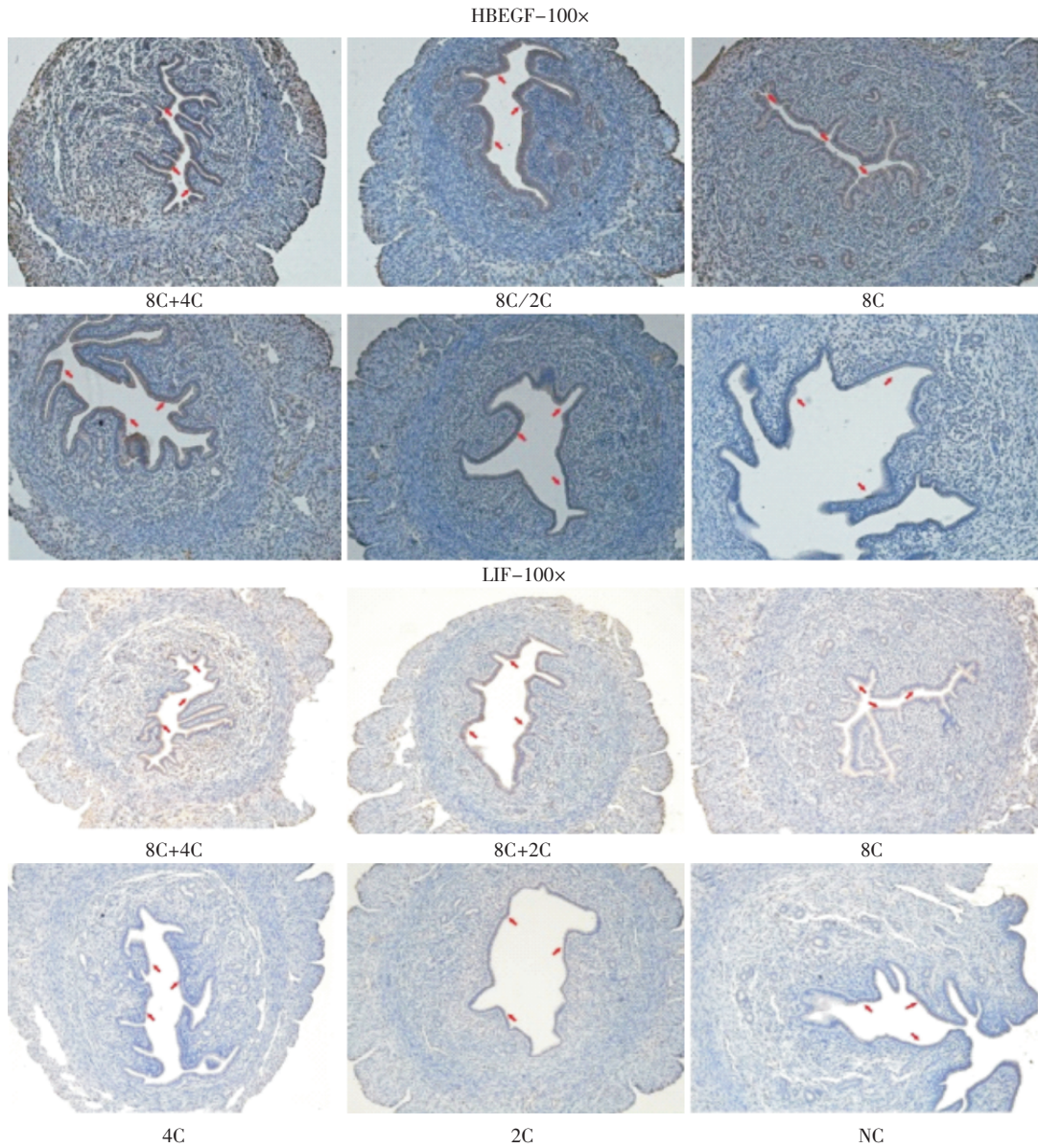
3 讨论

小鼠子宫内膜容受性于孕 d4 天早晨开始开放^[8], 夜间达到高峰^[9], 遂选择于移植后 36 h 即假孕 d4 天夜间取标本进行相关形态与分子生物学分析。临床工作中对于非优质胚胎的移植以及冷

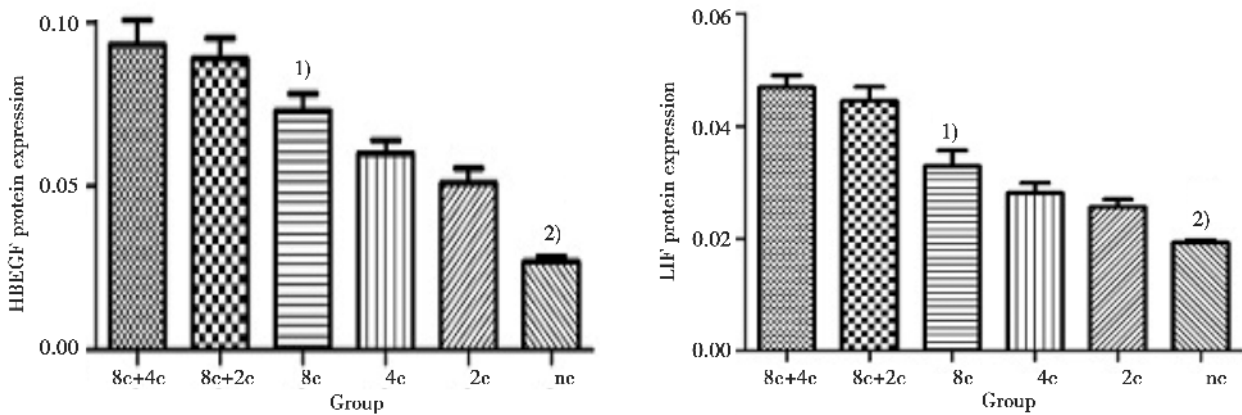


A: Western blots; B, C: Densitometry measurements and normalized to GAPDH. $\bar{x} \pm s, n = 10$. The protein expression level of HBEGF and LIF had significant difference among the groups ($F = 150.2, P < 0.001; F = 58.3, P < 0.001$). 1) Group 8c+4c and 8c+2c vs 8c, $P < 0.001$; Group 4c and 2c vs 8c, $P < 0.001$; 2) Group 4c and 2c vs NC, $P < 0.001$

图 4 western blotting 检测 HBEGF、LIF 的表达水平
Fig.4 HBEGF and LIF expression levels in the mice endometrium by Western blotting



➡: The expression levels of HBEGF and LIF in the mice endometrium were figured out by red row.



The expression level of HBEGF and LIF had significant difference among the groups ($\bar{x} \pm s, n = 10, F = 22.7, P < 0.001; F = 29.2, P < 0.001$).

1) Group 8c+4c and 8c+2c vs 8c, $P < 0.05$; Group 4c and 2c vs 8c, $P < 0.05$; 2) Group 4c and 2c vs NC, $P < 0.001$.

图 3 免疫组织化学染色检测 HBEGF、LIF 的表达情况 (×100)

Fig.3 HBEGF and LIF expression levels in the mice endometrium by immunohistochemical staining (×100)

冻价值一直存在争议,评分6细胞2级以上的6细胞胚胎属于优质胚胎,但又不是最优质形态,所以本实验没有纳入研究。HBEGF在着床前6~7h即在胚泡周围被诱发表达,是目前已知在着床位点发生的最早分子事件^[10]。Das等^[11]用原位杂交法证实HBEGF高表达于胚泡植入部位的子宫内膜,而假孕小鼠子宫内膜HBEGF低表达,提示胚泡本身的诱导信号可诱导子宫内膜HBEGF的表达。LIF主要在子宫内膜腔上皮和腺上皮表达,敲除LIF基因导致小鼠不孕^[12]。近期研究^[13]显示由于LIF的锚定效应使其在胚胎的黏附和侵入过程中发挥重要作用。本实验中均检测到HBEGF和LIF于子宫内膜腺上皮及腔上皮表达,与子宫内膜窗口期相符,符合实验的预测时间。

Ueda等^[4]将8细胞和原核期小鼠胚胎同时移植入假孕D1天小鼠子宫内,发现8细胞胚胎比原核期胚胎的着床提前了24h,这与公认的啮齿类动物着床窗口期只有24h相冲突,说明胚胎对子宫内膜容受性具有调整作用。有研究发现胚胎与子宫内膜上皮细胞共培养可改变子宫内膜上皮细胞基因的改变^[14],说明胚胎可诱导影响子宫内膜发生相应变化以及引起子宫内膜容受性的增加。Teklenburg等^[6]将停滞胚胎和正常胚胎分别与蜕膜化子宫内膜基质细胞共培养发现,停滞胚胎能够引起蜕膜化子宫内膜细胞容受性相关信号表达。但另一些研究^[15-17]表明具有发育潜能的胚胎能够通过腔上皮转换和放大信号从而诱导子宫内膜容受性,而非优质胚胎激活蜕膜细胞的应激网络系统。有临床研究发现D3、D5续贯移植有助于提高反复失败患者的临床妊娠率,间接说明第三天胚胎进入子宫对子宫内膜容受性有一定的诱导作用,使子宫内膜更有利于后期D5囊胚的着床^[15]。

此次动物实验大体结果提示8c+4c和8c+2c组种植率较8c组胚胎种植数有提高的趋势,8c+4c组与8c组相比差异有统计学意义,4c与2c组胚胎着床率接近0,间接支持非优质胚胎的加入可能促进了优质胚胎的种植。进而我们对移植后小鼠胚胎种植窗期子宫内膜容受性因子HBEGF、LIF进行检测,发现胚胎对子宫内膜容受性具有正向诱导作用,4细胞和2细胞胚胎对子宫内膜容受性的诱导作用比8细胞胚胎弱,然而4细胞和2细胞胚胎诱导作用的强弱没有显著性差异。此结果的可能原因有:①非优质胚胎虽然发育潜能有

限,但仍有部分功能,从而能够刺激子宫内膜容受性因子的表达。②优质胚胎具有良好的发育潜能,分泌合成功能强于非优质胚胎,所以对子宫内膜的诱导作用强,这与Weimar报道^[16]的蜕膜化基质细胞能够在体外向正常发育的胚胎迁移相一致。③非优质胚胎发育潜能有限,不同等级非优质胚胎移植入子宫后最终成为停滞胚胎,所以对子宫内膜容受性的诱导作用没有显著性差异。

综上所述,本研究表明:胚胎对子宫内膜容受性因子HBEGF和LIF具有正向诱导作用,4细胞和2细胞胚胎诱导作用的强弱没有显著性差异,4细胞和2细胞胚胎对子宫内膜容受性的诱导作用低于8细胞胚胎。然而,本实验仍存在一些不足,本实验并未涉及到在胚胎质量一致情况下,比较不同胚胎数量对内膜的诱导作用,这也是我们下一步探讨的方向和需要研究的问题,目前相关实验正在进一步完善中。我们相信以此结果为基础的相关后续研究,必将能更好地解释胚胎级别与内膜的相互作用。

参考文献

- [1] 张宁锋,陈静华,王文军,等.移植胚胎选择的量化指标[J].中山大学学报(医学科学版),2012,33(1):131-135.
ZHANG NF, CHEN JH, WANG WJ, et al. Quantitative clinical standard of embryo selection[J]. J Sun Yat-Sen Univ(Med Sci), 2012,33(1):131-135.
- [2] SIMON C, MARTIN JC, PELLICER A. Paracrine regulators of implantation[J]. Baillieres Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol, 2000, 14(5): 815-826.
- [3] REVEL A. Defective endometrial receptivity[J]. Fertil Steril, 2012, 97(5):1028-1032.
- [4] UEDA O, YOROZU K, KAMADA N, et al. Possible expansion of "Window of Implantation" in pseudopregnant mice: time of implantation of embryos at different stages of development transferred into the same recipient[J]. Biol Reprod, 2003,69(3):1085-1090.
- [5] TEKLENBURG G, SALKER M, MOLOKHIA M, et al. Natural selection of human embryos: decidualizing endometrial stromal cells serve as sensors of embryo quality upon implantation[J]. PLoS One, 2010,5(4): e10258.
- [6] 李婷婷,方丛,贾磊,等.小鼠早期完整胚胎诱导子宫内膜白血病抑制因子和整合素 $\beta 3$ 表达并提高子宫内膜容受性[J].中国病理生理杂志,2012,28

- (2): 193–200.
- LI TT, FANG C, JIA L, et al. Mouse early integral embryo induces expression of endometrial integrin β 3 and leukaemia-inhibitory factor and improves uterine receptivity in mice [J]. *Chin J Pathophysiol*, 2012, 28(2): 193–200.
- [7] CHA J, SUN X, DEY SK. Mechanisms of implantation: strategies for successful pregnancy [J]. *Nat Med*, 2012, 18(12): 1754–1767.
- [8] WANG HB, DEY SK. Roadmap to embryo implantation: clues from mouse models [J]. *Nat Rev Genet*, 2006, 7(3): 185–199.
- [9] PHILIP J, LEACH RE, ARMANT DR. Diverse functions of HBEGF during pregnancy [J]. *Mol Reprod Dev*, 2009, 76(12): 1116–1127.
- [10] DAS SK, WANG XN, PARIJA BC, et al. Heparin-binding EGF-like growth factor gene is induced in the mouse uterus temporally by the blastocyst solely at the site of its apposition: a possible ligand for interaction with blastocyst EGF-receptor in implantation [J]. *Development*, 1994, 120(5): 1071–1083.
- [11] DIMITRIADISE, WHITECA, JONESRL, et al. Cytokines, chemokines and growth factors in endometrium related to implantation [J]. *Hum Reprod Update*, 2005, 11(6): 613–630.
- [12] DIMITRIADIS E, NIE G, HANNAN N, et al. Local regulation of implantation at the human fetal–maternal interface [J]. *Int J Dev Biol*, 2010, 54(2/3): 313–322.
- [13] SCHMALTZ –PANNEAUA B, CORDOVA A, DHORNE–POLLETC S. Early bovine embryos regulate oviduct epithelial cell gene expression during in vitro co-culture [J]. *Anim Reprod Sci*, 2014, 149(3–4): 103–116.
- [14] BROSENS JJ, SALKER MS, TEKLENBURG G, et al. Uterine selection of human embryos at implantation [J]. *Sci Rep*, 2014, 4: 3894.
- [15] FANG C, HUANG R, LITT, et al. Day–2 and day–3 sequential transfer improves pregnancy rate in patients with repeated IVF –embryo transfer failure: a retrospective case –control study [J]. *Reprod Biomed Online*, 2013, 26(1): 30–35.
- [16] WEIMAR CH, KAVELAARS A, BROSENS JJ, et al. Endometrial stromal cells of women with recurrent miscarriage fail to discriminate between high– and low–quality human embryos [J]. *PLoS One*, 2012, 7(7): e41424.
- [17] 张鹏, 范靖. MiR–29a 促进小鼠子宫内膜的蜕膜化 [J]. *中山大学学报(医学科学版)*, 2016, 37(1): 1–8.
- ZHANG P, FAN LQ. MiR–29a promotes endometrial decidualization in mice [J]. *J Sun Yat–sen Univ (Med Sci)*, 2016, 37(1): 1–8.

(编辑 徐杰)